

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE29.01.03  
批

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 1月31日

REC'D 28 MAR 2003

WIPO

PCT

出願番号

Application Number:

特願2002-023897

[ST.10/C]:

[JP2002-023897]

出願人

Applicant(s):

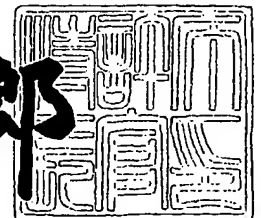
アークレイ株式会社

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月11日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3014863

【書類名】 特許願

【整理番号】 R5757

【提出日】 平成14年 1月31日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/06

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ  
株式会社内

【氏名】 米原 聡

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000040

【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

【代表者】 池内 寛幸

【電話番号】 06-6135-6051

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 139757

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0107559

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖化タンパク質の測定キット

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酸化還元反応を用いた糖化タンパク質の測定に使用する測定キットであって、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを含有する試料の前処理用試薬と、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、酸化還元酵素および発色基質を含有する発色用試薬とを含む糖化タンパク質の測定キット。

【請求項 2】 糖化タンパク質が、糖化ヘモグロビンである請求項 1 記載の測定キット。

【請求項 3】 前処理用試薬のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、糖化された $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用する酵素であり、発色用試薬のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、糖化された $\alpha$ -アミノ基および糖化されたアミノ酸残基側鎖に特異的に作用する酵素である請求項 1 または 2 記載の測定キット。

【請求項 4】 さらに、プロテアーゼを含有するプロテアーゼ試薬を含む請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項 5】 プロテアーゼが、メタロプロテアーゼ、ブロメライン、パパイン、トリプシン、プロティナーゼ K、ズブチリシンおよびアミノペプチダーゼからなる群から選択された少なくとも一つのプロテアーゼである請求項 4 記載の測定キット。

【請求項 6】 プロテアーゼが、糖化ヘモグロビンを選択的に分解するプロテアーゼであって、メタロプロテアーゼ、ブロメライン、パパイン、ブタ膵臓由来トリプシンおよび Bacillus subtilis 由来のプロテアーゼからなる群から選択された少なくとも一つのプロテアーゼである請求項 4 記載の測定キット。

【請求項 7】 プロテアーゼ試薬が、さらにテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含有する請求項 4 ～ 6 のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項 8】 プロテアーゼ試薬におけるテトラゾリウム化合物 (A) とアジ化ナトリウム (B) との含有割合 (モル比 A : B) が、 $A : B = 20 : 3 \sim 20 : 12$  の範囲である請求項 7 記載の測定キット。

【請求項 9】 プロテアーゼ試薬において、プロテアーゼがメタロプロテアー

ゼであって、さらにCaおよびNaを含有し、メタロプロテアーゼ濃度が100～40,000 U/L、Ca濃度が0.1～50 mmol/L、Na濃度が5～1000 mmol/Lである請求項4～8のいずれか一項に記載の記載の測定キット。

【請求項10】 発色基質がN-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルメタナリウムである請求項1～9のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項11】 前処理用試薬および発色用試薬の少なくとも一方が、さらに界面活性剤を含む請求項1～10のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項12】 プロテアーゼ試薬が、さらに界面活性剤を含む請求項4～11のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項13】 界面活性剤が、ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチレンフェノールエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルおよびポリオキシエチレンアルキルエーテルからなる群から選択された少なくとも一つの界面活性剤である請求項11または12記載の測定キット。

【請求項14】 前処理用試薬が、さらにCHES、MOPS、TAPS、EPPS、リン酸、HEPPSO、POPSOおよびホウ酸からなる群から選択された少なくとも一つの緩衝剤を含有し、そのpHが、8.0～10.0の範囲である請求項1～13のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項15】 発色用試薬が、さらにMES、Tris、リン酸、MOPS、TES、HEPES、HEPPSOおよびEPPSからなる群から選択された少なくとも一つの緩衝剤を含有し、そのpHが、6.0～9.0の範囲である請求項1～14のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項16】 プロテアーゼ試薬が、さらにTris、MES、DIPSO、TES、POPSO、HEPES、MOPSO、Bis-Tris、MOPS、ADA、PIPES、ACESおよびリン酸からなる群から選択された少なくとも一つの緩衝剤を含有し、そのpHが、5.0～7.0の範囲である請求項4～15のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項17】 テトラゾリウム化合物が、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルフィドフェニル)-2H-テトラゾリウム塩である請求項7～16のいずれか一項

に記載の測定キット。

【請求項 18】 前処理用試薬が、さらにウリカーゼおよびビリルビンオキシダーゼの少なくとも一方を含む請求項 1～17 のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項 19】 発色用試薬が、さらにアジ化ナトリウムを含む請求項 1～18 のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項 20】 前処理用試薬において、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが糖化された  $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用する酵素であり、その濃度が 10～5000 U/リットルの範囲、緩衝剤濃度が 5～200 mmol/リットルの範囲であり、pH が 8.0～10.0 の範囲である請求項 1～19 のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項 21】 プロテアーゼ試薬におけるメタロプロテアーゼの濃度が、100～10,000 KU/リットルの範囲、テトラゾリウム化合物濃度が 0.1～10 mmol/リットルの範囲、アジ化ナトリウム濃度が 0.08～4 mmol/リットルの範囲、Ca 濃度が 0.1～50 mmol/リットルの範囲、Na 濃度が 5～1000 mmol/リットルの範囲、緩衝剤濃度が 0.1～500 mmol/リットルの範囲であり、pH が 5.0～7.0 の範囲である請求項 4～20 のいずれか一項に記載の測定キット。

【請求項 22】 発色用試薬において、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、糖化された  $\alpha$ -アミノ基および糖化されたアミノ酸残基側鎖に特異的に作用する酵素であり、その濃度が 100～50,000 U/リットルの範囲、ペルオキシダーゼ濃度が 0.1～400 KU/リットルの範囲、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム濃度が 0.02～2 mmol/リットルの範囲、緩衝剤濃度が 10～500 mmol/リットルの範囲であり、pH が 6～9 の範囲である請求項 1～21 のいずれか一項に記載の測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、糖化タンパク質の測定キットに関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

糖化タンパク質の中でも、例えば、血液中の糖化ヘモグロビン（糖化Hb）は、生体内血糖値の過去の履歴を反映しているため、糖尿病の診断や治療等における重要な指標とされている。

## 【0003】

このような糖化Hbは、例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法、ミニカラム法、免疫法、色素法等により、糖化率や糖化量として測定されている。しかし、前記HPLC法の場合は、例えば、糖化Hbを測定するための専用機が必要であり、また、免疫法や色素法では、例えば、測定用のセルの汚れや測定精度等に問題があった。

## 【0004】

そこで、糖化Hb等の糖化タンパク質について、特殊な測定機器が不要であり、操作も簡便である酵素による酸化還元反応を用いた測定方法が、例えば、生化学分析や臨床検査等において適用されている。

## 【0005】

前記酸化還元反応を用いた糖化Hb質の測定は、例えば、以下に示すようにして行われる。まず、糖化Hbを含む試料をフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、「FAOD」という）で処理し、これを糖化Hbの糖化部分に作用させて過酸化水素を発生させる。この過酸化水素量は、前記糖化Hb量に対応する。そして、このFAOD処理後の前記試料に、ペルオキシダーゼ（以下、「POD」という）および還元剤を添加し、前記PODを触媒として前記過酸化水素と前記還元剤との間で酸化還元反応させる。この時、前記還元剤として、酸化されることにより発色する還元剤を用いれば、その発色の測定により前記過酸化水素量を測定でき、この結果、試料中の糖化Hb量を知ることができる。

## 【0006】

## 【発明が解決しようとする課題】

しかし、このような従来の測定方法は、測定感度が十分ではなかった。また、測定精度に関しては、例えば、実際に試料中に含まれる糖化Hbに対応する以上

の過酸化水素が発生したり、患者によっては一時的に糖化Hbの測定値が急激に増加するという現象が見られることがあるため、さらなる精度の向上が求められていた。また、さらに迅速かつ簡便に測定できることも要求されていた。

#### 【0007】

そこで、本発明の目的は、酸化還元反応を用いた糖化Hb等の糖化タンパク質の測定に使用する測定キットであって、測定精度、測定感度、取り扱いに優れるキットの提供である。

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するために、本発明の糖化タンパク質の測定キットは、酸化還元反応を用いた糖化タンパク質の測定に使用する測定キットであって、FAODを含有する試料の前処理用試薬と、FAOD、酸化還元酵素および発色基質を含有する発色用試薬とを含むことを特徴とする。

#### 【0009】

本発明者らは、測定精度の向上を図るべく鋭意研究を行った結果、以下の事を突き止めた。つまり、全血中には、本来、糖化タンパク質の他に遊離の糖化アミノ酸が存在しており、前記FAODは、このような糖化アミノ酸に対しても作用する。このため、前述のようなFAODを用いて糖化タンパク質の測定を行った場合、糖化タンパク質とFAODとの酸化還元反応だけでなく、糖化アミノ酸とFAODとの酸化還元反応も生じてしまい、見かけ上、糖化タンパク質の測定値が増加してしまうのである。さらに、同じ患者の全血試料について、全く同じ条件で前記測定方法により測定を行った場合でも、患者によっては採血時が異なると測定値が著しく変動するという問題に関しては、主に、点滴等を受けた患者に見られる現象であり、このように測定値が変動するのは、点滴等の成分として、例えば、グルコース等の糖類や各種アミノ酸が含まれると、これらの外来成分から糖化アミノ酸が生成され、一過的に糖化アミノ酸が増加するためであることを解明したのである。そこで、全血試料中に恒常的な糖化アミノ酸や一過性の外来糖化アミノ酸が存在しても、本発明のように、試料の前処理用試薬にFAODを含有させれば、前記酸化還元反応に先立って、前記前処理試薬を添加することに

よって、試料中の糖化アミノ酸が分解され、前述のような糖化アミノ酸による測定値の上昇が抑制されることを、本発明者らが初めて見出したのである。このため、本発明の測定キットを使用すれば、迅速かつ簡便に酸化還元反応を用いた糖化タンパク質の測定を優れた精度で行うことができ、さらに、点滴を受けた患者の血液試料であっても、同様の条件で測定できる。また、本発明の測定キットを用いた測定は、前述のように測定精度に優れるため、各種糖化タンパク質の指標としての信頼性も増し、臨床医療等の分野において有用な測定キットとなる。

#### 【0010】

本発明の測定キットは、測定対象物が、例えば、糖化Hbであることが好ましい。このような測定キットによれば、糖化Hbの糖尿病診断の指標としての信頼性が増し、臨床医療等の分野において有用となるからである。

#### 【0011】

なお、本発明において、前処理試薬に含有させるFAODは、前記糖化アミノ酸を分解するものであるため、以下、「分解用FAOD」ともいい、発色用試薬に含有させるFAODは、糖化タンパク質に作用させるものであることから、以下、「測定用FAOD」ともいう。

#### 【0012】

本発明において、さらに、プロテアーゼを含有するプロテアーゼ試薬を含むことが好ましい。前記FAODは、糖化タンパク質よりも、糖化アミノ酸やより短い糖化ペプチドに作用し易いという性質を有している。したがって、前記プロテアーゼ試薬により、試料中の糖化タンパク質を分解すれば、さらに発色用試薬における測定用FAODが作用し易くなり、測定精度も向上する。

#### 【0013】

前記プロテアーゼとしては、後述する各種プロテアーゼが使用できるが、測定対象物が糖化Hbの場合、糖化Hbを選択的に分解する、メタロプロテアーゼ、ブロメライン、パパイン、ブタ膵臓由来トリプシンおよびBacillus subtilis由来のプロテアーゼからなる群から選択された少なくとも一つのプロテアーゼであることが特に好ましい。この中でも好ましくはメタロプロテアーゼ、Bacillus subtilis由来のプロテアーゼである。このようなプロテアーゼを使用すれば



、糖化Hb以外の糖化タンパク質や糖化ペプチドは分解され難いため、前記他の糖化タンパク質等にはFAODも作用し難く、糖化Hbのみの測定が可能になる。

#### 【0014】

本発明において、前記プロテアーゼ試薬が、さらにテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含有することが好ましい。このようにプロテアーゼ試薬にテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含有させれば、測定感度を向上できると同時に、テトラゾリウム化合物によって、前記試料中に含まれる還元物質等が酸化還元反応に与える影響を除去でき、測定精度をも向上できるからである。

#### 【0015】

また、前記プロテアーゼ試薬において、プロテアーゼとしてメタロプロテアーゼを使用する場合は、さらにCaおよびNaを含有し、メタロプロテアーゼ濃度が100～40,000KU/L、Ca濃度が0.1～50mmol/L、Na濃度が5～1000mmol/Lであることが好ましい。このように、前記濃度範囲になるように、メタロプロテアーゼ、CaおよびNaを共存させれば、メタロプロテアーゼの安定性が向上し、例えば、低温だけでなく常温条件下においてもメタロプロテアーゼの失活を防止して安定に保存することができる。なお、CaおよびNaは、使用時に、それぞれ $\text{Ca}^{2+}$ および $\text{Na}^{+}$ にイオン化すればよい。

#### 【0016】

なお、前記プロテアーゼ試薬における各物質の濃度は、前記濃度範囲には限定されず、例えば、前記濃度範囲と同様の含有割合であることが好ましい。これは、反応溶液に対する前記プロテアーゼ試薬の添加割合（希釈率）によって、反応に必要な前記各物質の添加量は調整可能だからである。なお、他の物質や他の試薬についても同様である。

#### 【0017】

本発明の測定キットとしては、前記前処理用試薬に含有させる分解用FAODと、前記発色用試薬に含有させる測定用FAODとに、例えば、異なる基質特異

性のFAODを使用する第1の測定キットと、同じFAODを使用する第2および第3の測定キットとがあげられる。

【0018】

なお、FAODには、後述するように、例えば、 $\alpha$ -アミノ基の糖化部分に作用するもの、リジンやアルギニン等のアミノ酸残基の側鎖アミノ基の糖化部分に作用するもの、および前記両方の糖化部分に作用するもの等があり、その基質特異性はFAODの種類により様々である。糖化タンパク質が糖化Hbの場合、前記 $\alpha$ -アミノ基の糖化部分、前記側鎖アミノ基の糖化部分または両方の糖化部分のいずれにFAODを作用させても、その量を測定することが可能である。前記FAODとは、一般名称であり、その基質は、糖化アミノ酸には限られず、例えば、糖化タンパク質や糖化ペプチドにも作用する。

【0019】

本発明において、第1の測定キットとしては、前述のように、前処理用試薬に含有させる分解用FAODと、発色用試薬に含有させる測定用FAODとに、異なる基質特異性のFAODを使用することが好ましい。このような測定キットを用いれば、前記糖化アミノ酸は分解用FAODによって分解され、糖化タンパク質については、前記分解用FAODが作用していない異なる糖化部分に、前記測定用FAODを作用させることができるため、糖化アミノ酸の影響を受けず、測定精度を向上できるからである。

【0020】

具体的には、例えば、前記分解用FAODが、糖化 $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用するFAODであり、前記測定用FAODが、糖化 $\alpha$ -アミノ基および糖化側鎖アミノ基に特異的に作用するFAODであることが好ましい。前記測定用FAODは、 $\alpha$ -アミノ基糖化部分および側鎖アミノ基糖化部分の両方に作用するため、従来の方法であれば、前述のように $\alpha$ -アミノ基が糖化された糖化アミノ酸にも作用していた。しかし、本発明の測定キットを使用すれば、前処理用試薬での処理によって、前記糖化アミノ酸は、予め、前記糖化 $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用する分解用FAODに分解されているため、これに測定用FAODが作用することはなく、見かけ上の測定値の増加が抑制されて精度が向上する。また、測

定用FAODは、前述のように $\alpha$ -アミノ基糖化部分および側鎖アミノ基糖化部分の両方に作用するが、予め、糖化タンパク質の $\alpha$ -アミノ基糖化部分も分解用FAODによって分解されているため、本発明における前記発色用試薬で処理すれば、糖化タンパク質の側鎖アミノ基糖化部分のみに測定用FAODを作用させることができる。このため、特に側鎖アミノ基の糖化量に特徴がある糖化Hbの測定に、有用な測定キットであるといえる。

#### 【0021】

つぎに、前記第2の測定キットは、前処理用試薬の前記分解用FAODおよび発色用試薬の前記測定用FAODとして、同じFAODを使用し、糖化タンパク質を分解し、かつ、前記分解用FAODを消化失活させるプロテアーゼを含有するプロテアーゼ試薬を含むことが好ましい。

#### 【0022】

この第2の測定キットの使用方法は、例えば、まず、前処理用試薬を試料に添加して糖化アミノ酸に分解用FAODを作用させた後、プロテアーゼ試薬を添加して糖化タンパク質をプロテアーゼで分解し、あわせて残存する分解用FAODもプロテアーゼにより消化分解する。そして、さらに前記発色用試薬を添加して測定用FAODを前記プロテアーゼ分解物に作用させ、前記酸化還元反応を行えばよい。

#### 【0023】

FAODは、前述のように測定する糖化タンパク質よりも、糖化アミノ酸やより短い糖化タンパク質のペプチド断片に対して作用し易いという性質を有している。このため、分解用FAODを含有する前処理用試薬を添加しても、酵素の反応速度論から、糖化アミノ酸を分解する処理時間においては、前記FAODは糖化タンパク質にはあまり作用しないといえる。しかし、続くプロテアーゼ試薬による処理の間も前記分解用FAODの活性が残存していると、プロテアーゼ処理と併行して、プロテアーゼによる糖化タンパク質分解物（すなわち糖化アミノ酸や糖化タンパク質のペプチド断片）に前記分解用FAODが作用してしまい、後に測定用FAODを含む発色用試薬を添加しても、すでに前記糖化タンパク質の分解物の一部には分解用FAODが作用してしまった状態となり、反対に測定精

度が低下するおそれがある。したがって、前記第2の測定キットのように、糖化タンパク質を分解し、かつ分解用FAODを消化失活させるプロテアーゼ試薬を含めば、糖化タンパク質の分解物は、前記分解用FAODとは未反応のままで維持され、続いて添加する発色用試薬中の測定用FAODと反応することができる。このため測定精度も向上するのである。

#### 【0024】

一方、第3の測定キットは、分解用FAODと測定用FAODと同じFAODを用いて場合であっても、前述の第2の測定キットのように、プロテアーゼ試薬で残存する分解用FAODを失活させなくとも、例えば、前処理用試薬の前記分解用FAOD濃度と、発色用試薬の前記測定用FAOD濃度とを調整することによって、高精度な測定を実現できる。この場合、例えば、最終的な発色反応溶液における前記分解用FAOD(C)と測定用FAOD(D)の添加割合(活性比C:D)が、 $C:D=1:10\sim 1:1000$ の範囲になるように、前処理用試薬と発色用試薬のFAOD濃度を設定することが好ましい。このような添加割合であれば、プロテアーゼ試薬で処理する際に、前記分解用FAODが残存しても、酵素の反応速度論の点から糖化タンパク質には作用し難いからである。

#### 【0025】

本発明において、前記発色基質は、例えば、酸化により発色する基質や還元により発色する基質等が使用できるが、好ましくは、酸化により発色する基質であり、具体的には、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウムであることが好ましい。

#### 【0026】

このように、発色基質としてDA-64を使用する場合に、前記プロテアーゼ試薬がテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含有すると、これらの3つの成分が反応系において混合することにより、DA-64が誤発色を起こす場合がある。このように誤発色が生じると、例えば、発色量の測定においてバックグラウンドが高くなり、また、十分量添加したDA-64が不足するという問題が生じる。しかし、前述のように、各試薬が前記濃度範囲で各成分を含有すれば、反応系におけるDA-64の誤発色も防止される。このため、前記バックグラ

ウンドの上昇も抑制でき、より一層高精度な測定が可能になる。

【 0 0 2 7 】

本発明において、前記前処理用試薬、プロテアーゼ試薬、発色用試薬が、さらに界面活性剤を含んでもよい。

【 0 0 2 8 】

本発明において、前記各種試薬が、CHES、MOPS、MES、Tris、リン酸、TES、TAPS、HEPES、HEPPSO、ホウ酸、トリエタノールアミン、BES、MOPSO、EPPS、POPSO、ADA、PIPES、ACES、Bis-Tris からなる群から選択された少なくとも一つの緩衝剤を含有することが好ましい。前記各種試薬はそれぞれ酵素を含有するため、緩衝剤を添加することにより、例えば、至適 pH において前記酵素を作用できる。

【 0 0 2 9 】

具体的には、前記前処理用試薬が、さらにCHES、MOPS、TAPS、EPPS、リン酸、HEPPSO、POPSO、ホウ酸からなる群から選択された少なくとも一つの緩衝剤を含有し、その pH が、8.0～10.0 の範囲であることが好ましい。

【 0 0 3 0 】

本発明において、前記プロテアーゼ試薬が、さらにTris、MES、DIPSO、TES、POPSO、HEPES、MOPSO、Bis-Tris、MOPPS、ADA、PIPES、ACES、リン酸からなる群から選択された少なくとも一つの緩衝剤を含有し、その pH が、5.0～7.0 の範囲であることが好ましい。

【 0 0 3 1 】

本発明において、前記発色用試薬が、さらにMES、Tris、リン酸、MOPPS、TES、HEPES、HEPPSO、EPPS からなる群から選択された少なくとも一つの緩衝剤を含有し、その pH が、6.0～9.0 の範囲であることが好ましい。

【 0 0 3 2 】

前記前処理用試薬は、さらにウリカーゼおよびビリルビンオキシダーゼの少な

くとも一方を含むことが好ましい。このようにウリカーゼを含有すれば、例えば、測定試料に含まれる尿酸を分解でき、また、ビリルビンオキシダーゼを含有すれば、ビリルビンを分解できる。この尿酸やビリルビンは還元力を有するため、このように分解すれば、さらに還元物質による影響が除去でき、測定精度を向上できるからである。

## 【0033】

本発明において、前記発色用試薬は、例えば、DA-64等の発色基質の誤発色を防止できることから、さらにアジ化ナトリウムを含むことが好ましい。

## 【0034】

本発明の測定キットにおける各試薬の具体的な組成としては、例えば、以下の組成があげられる。

## 【0035】

前記前処理用試薬は、例えば、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが糖化された $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用する酵素であり、その濃度が10～5000U／リットルの範囲、緩衝剤濃度が5～200mmol／リットルの範囲であり、pHが8.0～10.0の範囲であることが好ましい。

## 【0036】

前記プロテアーゼ試薬は、例えば、メタロプロテアーゼの濃度が、100～10,000KU／リットルの範囲、テトラゾリウム化合物濃度が0.1～10mmol／リットルの範囲、アジ化ナトリウム濃度が0.08～4mmol／リットルの範囲、Ca濃度が0.1～50mmol／リットルの範囲、Na濃度が5～1000mmol／リットルの範囲、緩衝剤濃度が0.1～500mmol／リットルの範囲であり、pHが5.0～7.0の範囲であることが好ましい。

## 【0037】

前記発色用試薬は、例えば、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、糖化された $\alpha$ -アミノ基および糖化されたアミノ酸残基側鎖に特異的に作用する酵素であり、その濃度が100～50,000U／リットルの範囲、ペルオキシダーゼ濃度が0.1～400KU／リットルの範囲、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム濃度が0.02～2mmol／リットルの範囲、緩衝

剤濃度が10～500mol／リットルの範囲であり、pHが6～9の範囲であることが好ましい。

#### 【0038】

本発明の測定キットは、例えば、全血、血漿、血清、血球等の他に、例えば、尿、髄液等の生体試料や、ジュース等の飲料水、醤油、ソース等の食品類等の試料に対しても適用でき、この中でも特に全血試料、血球試料に有用である。赤血球内の糖化Hbを測定する場合には、全血をそのまま溶血したり、全血から分離した赤血球を溶血し、この溶血試料を測定試料とすればよい。

#### 【0039】

測定対象物の糖化タンパク質としては、例えば、前述のような糖化Hb、糖化アルブミン等があげられるが、好ましくは糖化Hbである。

#### 【0040】

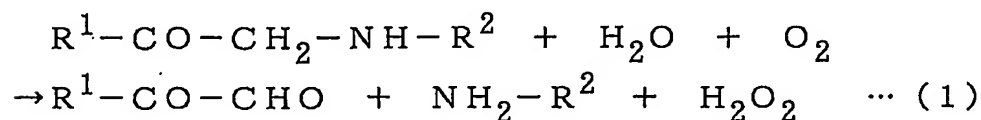
なお、本発明の測定キットにおける各種試薬は、各成分を水性溶媒に溶解した液系の試薬でもよいし、使用前に水性溶媒に溶解して使用するドライ系の試薬であってもよい。

#### 【0041】

##### 【発明の実施の形態】

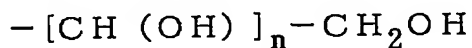
本発明の測定キットにおいて使用するFAODは、下記式(1)に示す反応を触媒するFAODであることが好ましく、例えば、 $\alpha$ -アミノ基が糖化された糖化アミンに特異的に作用するFAOD(以下、「FAOD- $\alpha$ 」という)、アミノ酸残基の側鎖アミノ基が糖化された糖化アミンに特異的に作用するFAOD(以下、「FAOD-S」という)、 $\alpha$ -アミノ基が糖化された糖化アミンおよび前記側鎖アミノ基が糖化された糖化アミンのいずれにも特異的に作用するFAOD(以下、「FAOD- $\alpha$ S」という)等があげられる。なお、「糖化アミン」とは、糖化タンパク質、糖化ペプチドおよび糖化アミノ酸等をいう。

#### 【0042】



## 【0043】

前記式(1)において、 $R^1$ は、水酸基もしくは糖化反応前の糖に由来する残基(糖残基)を意味する。前記糖残基( $R^1$ )は、反応前の糖がアルドースの場合はアルドース残基であり、反応前の糖がケトースの場合、ケトース残基である。例えば、反応前の糖がグルコースの場合は、アマドリ転位により、反応後の構造はフルクトース構造をとるが、この場合、糖残基( $R^1$ )は、グルコース残基(アルドース残基)となる。この糖残基( $R^1$ )は、例えば、



で示すことができ、 $n$ は、0～6の整数である。

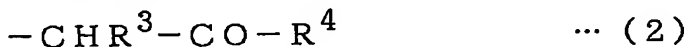
## 【0044】

前記式(1)において、 $R^2$ は、特に制限されないが、糖化アミンが糖化アミノ酸または糖化ペプチド(糖化タンパク質を含む)の場合、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されている場合と、それ以外のアミノ基(アミノ酸側鎖のアミノ基)が糖化されている場合とで異なる。

## 【0045】

前記式(1)において、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されている場合、 $R^2$ は、下記式(2)で示すアミノ酸残基またはペプチド残基である。この場合に前記式(1)の反応を特異的に触媒するのが前記FAOD- $\alpha$ およびFAOD- $\alpha$ Sである。

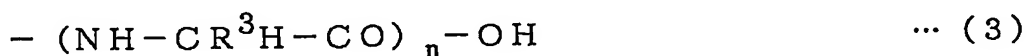
## 【0046】



## 【0047】

前記式(2)において、 $R^3$ はアミノ酸側鎖基を示し、 $R^4$ は水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基を示し、例えば、下記式(3)で示すことができる。下記式(3)において、 $n$ は、0以上の整数であり、 $R^3$ は、前述と同様に、アミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっても良い。

## 【0048】

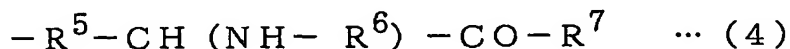




## 【0049】

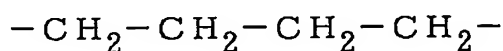
また、前記式(1)において、 $\alpha$ -アミノ基以外のアミノ基が糖化されている(アミノ酸側鎖基が糖化されている)場合、 $R^2$ は下記式(4)で示すことができる。この場合に前記式(1)の反応を特異的に触媒するのが前記FAOD-SおよびFAOD- $\alpha$ Sである。

## 【0050】



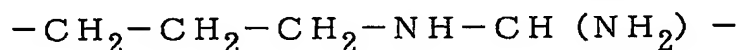
## 【0051】

前記式(4)において、 $R^5$ は、アミノ酸側鎖基のうち、糖化されたアミノ基以外の部分を示す。例えば、糖化されたアミノ酸がリジンの場合、 $R^5$ は



であり、

例えば、糖化されたアミノ酸がアルギニンの場合、 $R^5$ は、

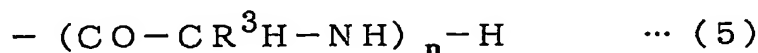


である。

## 【0052】

また、前記式(4)において、 $R^6$ は、水素、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(5)で示すことができる。なお、下記式(5)において、 $n$ は0以上の整数であり、 $R^3$ は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっても良い。

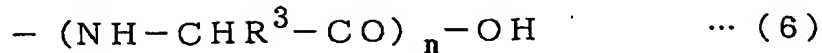
## 【0053】



## 【0054】

また、前記式(4)において、 $R^7$ は、水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(6)で示すことができる。なお、下記式(6)において、 $n$ は0以上の整数であり、 $R^3$ は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっても良い。

【0055】



【0056】

前記糖化 $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用するFAOD- $\alpha$ としては、例えば、市販の商品名フルクトシル-アミノ酸オキシダーゼ(FAOX-E)(キッコーマン社製)、ペニシリウム属由来のFAOD(特開平8-336386号公報)等があげられる。前記糖化されたアミノ酸側鎖に特異的に作用するFAOD-Sとしては、例えば、フサリウム属由来FAOD(日本生物工学会大会 平成12年度「Fusarium oxysporum由来アミノ酸オキシダーゼの基質特異性の変換; 藤原真紀 他」)等があげられる。また、前記糖化 $\alpha$ -アミノ基および糖化アミノ酸側鎖基の両方に作用するFAOD- $\alpha$ Sとしては、例えば、市販の商品名FOD(旭化成社製)、ギベレラ属由来FAOD(特開平8-154672号公報)、フサリウム属由来FAOD(特開平7-289253号公報)、アスペルギルス属由来FAOD(WO99/20039)等があげられる。

【0057】

本発明において使用する前記プロテアーゼとしては、例えば、セリンプロテアーゼ、チオールプロテアーゼ、メタロプロテイナーゼ等が使用でき、具体的には、メタロプロテアーゼ、トリプシン、プロテナーゼK、キモトリプシン、パパイン、ブロメライン、ズブチリシン、エラスターゼ、アミノペプチダーゼ等が使用できる。測定対象物が糖化Hbの場合は、前述のような前記糖化Hbを選択的に分解するプロテアーゼである、ブロメライン、パパイン、ブタ膵臓由来トリプシン、メタロプロテイナーゼ、Bacillus subtilis由来のプロテアーゼ等が特に好ましい。前記Bacillus subtilis由来プロテアーゼとしては、商品名プロテアーゼN(例えば、フルカ社製)、商品名プロテアーゼN「アマノ」(天野製薬社製)等があげられる。前記メタロプロテイナーゼとしては、Bacillus属由来メタロプロテイナーゼ(EC3.4.24.4)(例えば、東洋紡社製:商品名トヨチーム)等があげられる。これらの中でもより好ましくはメタロプロテイナーゼ、ブロメライン、パパインであり、特に好ましくはメタロプロテイナーゼである。

## 【 0 0 5 8 】

本発明において使用する界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチレンフェノールエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル等が使用できる。このポリオキシエチレンエーテル  $[C_L H_M - O - (CH_2 CH_2 O)_N H]$  は、ポリオキシエチレン鎖と炭化水素鎖とがエーテル結合しており、前記炭化水素鎖としては、例えば、アルキル基、アルキルフェニル基等があげられる。前記ポリオキシエチレン鎖の重量平均重合度 (N) は 8 ~ 23 の範囲であり、他方の炭化水素鎖の炭素数 (L) は 8 ~ 18 の範囲であることが好ましく、より好ましくは前記重量平均重合度 (N) が 8 ~ 15 の範囲であり、炭化水素鎖の炭素数 (L) が 8 ~ 16 の範囲であり、特に好ましくは前記重量平均重合度 (N) が 8 ~ 10 の範囲であり、炭化水素鎖の炭素数 (L) が 8 ~ 14 の範囲である。また、前記炭化水素鎖は、例えば、直鎖でもよく、分岐鎖を有していてもよい。前記ポリオキシエチレンエーテルの具体例としては、例えば、ポリオキシエチレン-p-t-オクチルフェニルエーテル、ポリエチレングリコール (10) ラウリルエーテル、ポリエチレングリコール (9) ラウリルエーテル等があげられる。

## 【 0 0 5 9 】

より具体的には、例えば、ポリオキシエチレン-p-t-オクチルフェニルエーテルである市販の T r i t o n 系界面活性剤等、ポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルである市販の T w e e n 系界面活性剤等、ポリオキシエチレンアルキルエーテルである市販の B r i j 系界面活性剤等が使用できる。この他に、例えば、ポリオキシエチレン (10) ラウリルエーテル、商品名 N i k k o l B L - 9 E X (ポリオキシエチレンの重量平均重合度 N が 9 : 和光純薬工業社製) 等のようなポリオキシエチレン (9) ラウリルエーテル、商品名 T e r g i t o l N P X (ポリオキシエチレンの重量平均重合度 N が約 10.5 : ナカライテスク社製) および商品名 T e r g i t o l N P - 4 0 (ポリオキシエチレンの重量平均重合度 N が 20 : ナカライテスク社製) 等のようなポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル等も使用できる。

## 【 0 0 6 0 】

本発明において使用するテトラゾリウム化合物としては、例えば、テトラゾール環の少なくとも2箇所に環構造置換基を有する構造であることが好ましく、より好ましくは、3箇所に環構造置換基を有する構造である。

## 【 0 0 6 1 】

前記テトラゾリウム化合物が、前述のように、前記テトラゾール環の少なくとも2箇所に環構造置換基を有する場合、前記置換基を、前記テトラゾール環の2位および3位に有することが好ましい。また、テトラゾリウム化合物が3箇所に環構造置換基を有する場合は、前記置換基を、前記テトラゾール環の2位、3位および5位に有することが好ましい。

## 【 0 0 6 2 】

また、テトラゾリウム化合物は、少なくとも2つの環構造置換基の環構造がベンゼン環であることが好ましい。前記ベンゼン環以外の環構造置換基としては、例えば、環骨格にSまたはOを含み、かつ共鳴構造である置換基があげられ、例えば、チエニル基、チアゾイル基等である。

## 【 0 0 6 3 】

また、前記テトラゾリウム化合物は、テトラゾール環の少なくとも3箇所に環構造置換基を有し、前記環構造置換基のうち少なくとも2つの環構造置換基の環構造がベンゼン環であることが好ましい。

## 【 0 0 6 4 】

また、少なくとも1つの環構造置換基が官能基を有することが好ましく、前記官能基の数が多いことがより好ましい。

## 【 0 0 6 5 】

前記官能基としては、電子吸引性の官能基が好ましく、例えば、ハロゲン基、エーテル基、エステル基、カルボキシ基、アシル基、ニトロソ基、ニトロ基、ヒドロキシ基、スルホ基等があげられる。この他にも、例えば、ヒドロペルオキシ基、オキシ基、エポキシ基、エピジオキシ基、オキソ基等の酸素を含む特性基や、メルカプト基、アルキルチオ基、メチルチオメチル基、チオキソ基、スルフィノ基、ベンゼンスルホニル基、フェニルスルホニル基、p-トルエンスルホニル基

、p-トリルスルホニル基、トシル基、スルファモイル基、イソチオシアネート基等の硫黄を含む特性基等があげられる。これらの電子吸引性官能基の中でも、好ましくは、ニトロ基、スルホ基、ハロゲン基、カルボキシ基、ヒドロキシ基、メトキシ基、エトキシ基である。また、前記電子吸引性の官能基の他に、例えば、フェニル基 ( $C_6H_5-$ )、スチリル基 ( $C_6H_5CH=CH-$ ) 等の不飽和炭化水素基等もあげられる。なお、前記官能基は、解離によりイオン化していてもよい。

## 【0066】

前記テトラゾリウム化合物は、テトラゾール環の2位および3位にベンゼン環を有し、前記ベンゼン環のうち少なくとも一方が、ハロゲン基、カルボキシ基、ニトロ基、ヒドロキシ基、スルホ基、メトキシ基およびエトキシ基からなる群から選択された少なくとも1つの官能基を有することが好ましい。なお、前記両方のベンゼン環が、前記官能基を有してもよい。前記ベンゼン環において、いずれの箇所 (ortho-、meta-、para-) に前記官能基を有してもよい。また、官能基の数も特に制限されず、同じ官能基を有しても、異なる官能基を有してもよい。

## 【0067】

前記テトラゾリウム化合物は、例えば、前記テトラゾール環の2位、3位および5位にベンゼン環構造置換基を有する化合物として、例えば、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩 (以下、「WST-3」ともいう)、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム塩、3,3'-(1,1'-ビフェニル-4,4'-ジル)-ビス(2,5-ジフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、3,3'-[3,3'-ジメトキシ-(1,1'-ビフェニル)-4,4'-ジル]-ビス[2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム塩]、2,3-ジフェニル-5-(4-クロロフェニル)テトラゾリウム塩、2,5-ジフェニル-3-(p-ジフェニル)テトラゾリウム塩、2,3-ジフェニル-5-(p-ジフェニル)テトラゾリウム塩、2,5-ジフェニル-3-(4-スチリルフェニル)テトラゾリウム塩、2,5-ジフェニル-3-(m-ト

リル)テトラゾリウム塩および2,5-ジフェニル-3-(p-トリル)テトラゾリウム塩等があげられる。

## 【0068】

また、前記テトラゾリウム化合物は、前述のような化合物には制限されず、これ他に、前記テトラゾール環の2箇所にベンゼン環構造置換基および1箇所にその他の環構造置換基を有する化合物も使用でき、例えば、2,3-ジフェニル-5-(2-チエニル)テトラゾリウム塩、2-ベンゾチアゾイル-3-(4-カルボキシ-2-メトキシフェニル)-5-[4-(2-スルホエチル カルバモイル)フェニル]-2H-テトラゾリウム塩、2,2'-ジベンゾチアゾイル-5,5'-ビス[4-ジ(2-スルホエチル)カルバモイルフェニル]-3,3'-(3,3'-ジメトキシ-4,4'-ビフェニレン)ジテトラゾリウム塩および3-(4,5-ジメチル-2-チアゾイル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム塩等があげられる。

## 【0069】

また、前記テトラゾール環の2箇所にベンゼン環構造置換基および1箇所に環構造でない置換基を有するテトラゾリウム化合物も使用でき、例えば、2,3-ジフェニル-5-シアノテトラゾリウム塩、2,3-ジフェニル-5-カルボキシテトラゾリウム塩、2,3-ジフェニル-5-メチルテトラゾリウム塩、2,3-ジフェニル-5-エチルテトラゾリウム塩等があげられる。

## 【0070】

前述のテトラゾリウム化合物の中でも、前述のように、環構造置換基を3つ有する化合物が好ましく、より好ましくは、環構造がベンゼン環である置換基を3つ有し、かつ電子吸引性官能基を多く有するものであり、特に好ましくは、WST-3である。なお、このようなテトラゾリウム化合物は、例えば、塩でもよいし、イオン化された状態等であってもよい。また、このテトラゾリウム化合物は、一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。

## 【0071】

本発明において使用する前記発色基質としては、例えば、DA-64、オルトフェニレンジアミン(OPD)、トリンダー試薬と4-アミノアンチピリンとを組み合わせた基質等があげらる。前記トリンダー試薬としては、例えば、フェノー

ル、フェノール誘導体、アニリン誘導体、ナフトール、ナフトール誘導体、ナフチルアミン、ナフチルアミン誘導体等があげらる。また、前記アミノアンチピリンの他に、アミノアンチピリン誘導体、バニリンジアミンスルホン酸、メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン (MBTH)、スルホン化メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン (SMBTH) 等も使用できる。このような発色性基質の中でも、特に好ましくは、前述のように、DA-64である。

## 【0072】

本発明において使用する酸化還元酵素としては、特に制限されないが、例えば、POD等があげられる。

## 【0073】

つぎに、本発明の測定キットについて、測定対象物が糖化Hbである例をあげて説明する。

## 【0074】

## (実施形態1)

この実施形態は、前処理用試薬の分解用FAODにFAOD- $\alpha$ を、発色用試薬の測定用FAODにFAOD- $\alpha$ Sをそれぞれ使用した前記第1の測定キットの一例である。

## 【0075】

この測定キットは、分解用FAODを含有する前処理用試薬、プロテアーゼを含有するプロテアーゼ試薬、および測定用FAOD、酸化還元酵素および発色基質を含有する発色用試薬から構成される。

## 【0076】

これらの前処理用試薬、プロテアーゼ試薬、発色用試薬は、それぞれ含有させる成分を水性溶媒に溶解することによって調製できる。

## 【0077】

## (前処理用試薬)

前処理用試薬は、最終的な発色反応溶液において、例えば、10～200倍に希釈され、好ましくは20～100倍に希釈される。したがって、前処理用試薬に含まれるFAOD等の濃度は、例えば、この希釈倍率等に応じて適宜決定でき

る。また、測定試料中の測定対象物または分解する糖化アミノ酸の量に応じて、前処理用試薬の試料への添加量を変化することによって、反応系におけるFAOD等の量を調整してもよい。

## 【0078】

具体的には、前処理用試薬における分解用FAOD濃度は、例えば、10～5000U/Lの範囲である。

## 【0079】

前記水性溶剤としては、特に制限されないが、例えば、水、前述のような各種緩衝剤を含む緩衝液等があげられる。前記緩衝剤の中でも、好ましくはCHES、MOPS、TAPS、EPPS、リン酸、HEPPSO、POPSO、ホウ酸であり、より好ましくはCHES、MOPS、TAPS、リン酸である。前記緩衝液の濃度は、例えば、5～200mol/Lの範囲であり、好ましくは20～150mol/Lの範囲である。また、前記緩衝液のpHは、例えば、pH8～10の範囲であり、好ましくは8.5～10.0の範囲である。

## 【0080】

また、この前処理用試薬は、分離用FAODの他に、さらに以下の成分を含有してもよい。

## 【0081】

界面活性剤を含有する場合、例えば、前述の界面活性剤が使用できるが、好ましくはポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルである。また、界面活性剤濃度は、例えば、0.03～200mmol/Lの範囲であり、好ましくは0.1～50mmol/Lの範囲である。

## 【0082】

ウリカーゼを含有する場合、その濃度は、例えば、1～2000U/Lの範囲であり、また、ビリルビンオキシダーゼを含有する場合、その濃度は、例えば、1～2000U/Lの範囲である。なお、これら両者を含有してもよい。

## 【0083】

(プロテアーゼ試薬)

つぎに、プロテアーゼ試薬は、最終的な発色反応溶液において、例えば、1.



1～3 倍に希釈される。したがって、前述の前処理用試薬と同様に、各成分の濃度は、この希釈倍率等に応じて適宜決定でき、また、試料中の糖化 H b 量等に応じて、試料への添加量を変化することにより、反応系におけるプロテアーゼ量を調整してもよい。

#### 【0084】

プロテアーゼとしては、例えば、前述のものが使用できる。プロテアーゼ試薬におけるプロテアーゼ濃度は、プロテアーゼがメタロプロテアーゼの場合、例えば、0.5～100 MU/L の範囲であり、好ましくは 1～40 MU/L の範囲である。

#### 【0085】

前記水性溶剤としては、特に制限されないが、例えば、水、前述のような各種緩衝剤を含む緩衝液等があげられる。前記緩衝剤の中でも、好ましくは MES、MOPS であり、より好ましくは MES である。前記緩衝液の濃度は、例えば、0.1～10 mmol/L の範囲であり、好ましくは 1～5 mmol/L の範囲であり、より好ましくは 1～3 mmol/L の範囲である。また、前記緩衝液の pH は、例えば、pH 5.0～7.0 の範囲であり、好ましくは 5.5～6.5 の範囲である。

#### 【0086】

また、このプロテアーゼ試薬は、前記プロテアーゼの他に、さらに以下の成分を含有してもよい。

#### 【0087】

他の成分としては、例えば、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムがあげられる。この場合、前記プロテアーゼ試薬は、例えば、テトラゾリウム化合物濃度が 0.1～10 mmol/L の範囲、アジ化ナトリウム濃度が 0.05～4 mmol/L の範囲であり、好ましくはテトラゾリウム化合物濃度が 0.6～5 mmol/L の範囲、アジ化ナトリウム濃度が 0.15～1.8 mmol/L の範囲であり、より好ましくはテトラゾリウム化合物濃度が 0.7～2.7 mmol/L の範囲、アジ化ナトリウム濃度が 0.2～1.5 mmol/L の範囲である。また、テトラゾリウム化合物 (A) とアジ化ナトリウム (B) との添加割合は、

(モル比A : B) は、 $A : B = 20 : 3 \sim 20 : 12$ の範囲であることが好ましく、より好ましくは $A : B = 20 : 5 \sim 20 : 11$ の範囲であり、特に好ましくは $A : B = 20 : 6 \sim 20 : 10$ の範囲である。

## 【0088】

また、プロテアーゼとしてメタロプロテアーゼを使用する場合は、さらにCa化合物およびNa化合物を含有してもよい。前記Ca化合物およびNa化合物としては、前記水性溶媒中で、 $Ca^{2+}$ および $Na^+$ にイオン化するものであれば特に制限されず、前記Ca化合物としては、例えば、塩化カルシウム( $CaCl_2$ )、 $CaSO_4$ 、 $(CH_3COO)_2Ca$ 等が使用でき、好ましくは $CaCl_2$ 、 $CaSO_4$ である。また、前記Na化合物としては、例えば、塩化ナトリウム( $NaCl$ )、 $CH_3COONa$ 、 $Na_2SO_4$ 、 $NaNO_3$ 等が使用でき、好ましくは $NaCl$ 、 $Na_2SO_4$ である。これらのCa化合物およびNa化合物は、それぞれ一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。

## 【0089】

メタロプロテアーゼの濃度は、前述のように、 $0.5 \sim 100 \text{ MU/リットル}$ の範囲であり、好ましくは $1 \sim 40 \text{ MU/リットル}$ の範囲である。

## 【0090】

一方、前記Ca化合物の濃度は、解離した $Ca^{2+}$ 濃度が $0.1 \sim 5 \text{ mmol/L}$ の範囲となるように、 $0.1 \sim 50 \text{ mmol/L}$ の範囲である。また、Na化合物の濃度は、解離した $Na^+$ 濃度が $5 \sim 1000 \text{ mmol/L}$ の範囲となるように、 $5 \sim 1000 \text{ mmol/L}$ の範囲であり、好ましくは $10 \sim 300 \text{ mmol/L}$ の範囲である。

## 【0091】

## (発色用試薬)

つぎに発色用試薬は、最終的な発色反応溶液において、例えば、 $2 \sim 20$ 倍に希釈され、好ましくは $3 \sim 10$ 倍、より好ましくは $4 \sim 8$ 倍に希釈される。この場合も前述と同様に、各成分の濃度は、この希釈倍率等に応じて適宜決定でき、また、試料中の糖化Hbや発生する過酸化水素の量に応じて、添加量を変化することにより、反応系における各成分の量を調整してもよい。

## 【0092】

発色用試薬における測定用FAODの濃度は、例えば、1～200KU/Lの範囲であり、好ましくは5～100KU/Lの範囲である。

## 【0093】

酸化還元酵素の濃度は、例えば、1～1000KU/Lの範囲であり、好ましくは10～200KU/Lの範囲である。

## 【0094】

前記発色基質の濃度は、例えば、0.001～100mmol/Lの範囲であり、好ましくは0.005～10mmol/Lの範囲であり、より好ましくは0.02～1mmol/Lの範囲である。

## 【0095】

前記水性溶剤としては、特に制限されないが、例えば、水、前述のような各種緩衝剤を含む緩衝液等があげられる。前記緩衝剤の中でも、好ましくはTris、リン酸である。前記緩衝液の濃度は、例えば、20～1000mmol/Lの範囲であり、好ましくは50～500mmol/Lの範囲である。また、前記緩衝液のpHは、例えば、pH6～9の範囲であり、好ましくは6.5～8の範囲である。

## 【0096】

## (使用方法)

つぎに、このような測定キットを使用して、血球中の糖化Hbを測定する方法を説明する。

## 【0097】

まず、全血をそのまま溶血し、または全血から遠心分離等の常法により血球画分を分離してこれを溶血し、溶血試料を調製する。この溶血方法は、特に制限されず、例えば、前述のような界面活性剤を用いる方法、超音波による方法、浸透圧の差を利用する方法等が使用できる。この中でも、操作の簡便性等の理由から、前記界面活性剤を用いる方法が好ましい。

## 【0098】

つぎに、前記溶血試料に、前記前処理用試薬を添加し、分解用FAODを試料

中の糖化アミノ酸に作用させて分解する。

#### 【0099】

この分解用FAOD- $\alpha$ Sの作用によって、前記溶血試料に含まれる $\alpha$ -アミノ基が糖化された糖化アミノ酸、および前記糖化Hb分解物のうち $\alpha$ -アミノ基の糖化部分が分解される。なお、前記FAOD- $\alpha$ 処理によっては、糖化アミノ酸の中でも側鎖アミノ基が糖化されたものは分解されずに残存する。しかし、この側鎖が糖化されたアミノ酸の糖化アミノ酸全体に対する割合および糖化Hbにおける糖化された側鎖アミノ基に対する割合から考えても、残存する糖化アミノ酸の影響は小さく、測定精度は十分に向上するといえる。

#### 【0100】

前記前処理用試薬の添加量は、血球濃度が30～60体積%の溶血試料30 $\mu$ Lに対して、例えば、300～3000 $\mu$ Lの範囲であり、好ましくは600～2400 $\mu$ Lの範囲である。前記前処理用試薬を添加した前処理反応液は、血球濃度1体積%に対して、前記分解用FAOD濃度が10～5000Umol/Lの範囲となることが好ましい。また、前記処理溶液のpHは、8～10の範囲が好ましく、より好ましくは8.5～10の範囲である。

#### 【0101】

この前処理は、前記前処理用試薬を添加してからインキュベートすることが好ましく、その条件は、例えば、10～37℃、0.1～20分間であり、好ましくは15～37℃、0.1～5分間である。

#### 【0102】

なお、この前処理用試薬が界面活性剤を含有する場合、例えば、前述のような溶血処理を別途行って溶血試料を調製する必要はない。つまり、前処理用試薬を全血または血球試料に添加することによって、界面活性剤による溶血処理と、分解用FAODによる糖化アミノ酸の分解処理の両方を行うことができるのである。

#### 【0103】

この場合、前記前処理用試薬を添加した前処理反応液は、血球濃度1体積%に対して、前記界面活性剤濃度が0.05～50mmol/Lの範囲となることが

好ましく、より好ましくは0.2~30 mmol/Lの範囲であり、特に好ましくは0.3~10 mmol/Lの範囲である。

## 【0104】

また、前記前処理用試薬が、前述のようにウリカーゼ、ビリルビンオキシダーゼを含有する場合、前記処理用試薬は、血球濃度1体積%に対して、前記ウリカーゼ濃度が0.4~4000 U/Lの範囲、ビリルビンオキシダーゼ濃度が0.4~4000 U/Lの範囲となることが好ましく、より好ましくはウリカーゼ濃度が3~1500 U/Lの範囲、ビリルビンオキシダーゼ濃度が1~700 U/Lの範囲であり、特に好ましくはウリカーゼ濃度が5~1000 U/Lの範囲、ビリルビンオキシダーゼ濃度が2~700 U/Lの範囲である。

## 【0105】

次に、前記前処理反応液に、プロテアーゼ試薬を添加し、試料中の糖化Hbに分解用FAODを作用させて分解する。

## 【0106】

プロテアーゼ試薬の添加量は、例えば、血球濃度が1体積%の前記前処理反応液10  $\mu$ Lに対して、例えば、50~300  $\mu$ Lの範囲であり、好ましくは60~180  $\mu$ Lの範囲である。前記プロテアーゼ試薬を添加したプロテアーゼ反応液は、血球濃度0.1体積%に対して、前記プロテアーゼ濃度が100~50,000 KU/Lの範囲となることが好ましく、より好ましくは300~30,000 KU/Lの範囲である。また、前記プロテアーゼ反応液のpHは、6~9の範囲が好ましく、より好ましくは7~8.5の範囲である。

## 【0107】

このプロテアーゼ処理は、前記プロテアーゼ試薬を添加してからインキュベートすることが好ましく、その条件は、例えば、25~37℃、3~30分間であり、好ましくは25~37℃、3~10分間であり、より好ましくは30~37℃、3~5分間である。

## 【0108】

また、このプロテアーゼ試薬が前述のようにテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含む場合、前記プロテアーゼ反応液は、前記プロテアーゼ濃度が

100~10,000 KU/Lの範囲であるのに対して、例えば、テトラゾリウム化合物0.1~10 mmol/Lの範囲、アジ化ナトリウム0.08~4.0 mmol/Lの範囲であり、好ましくはテトラゾリウム化合物0.6~5 mmol/Lの範囲、アジ化ナトリウム0.15~1.8 mmol/Lの範囲であり、より好ましくはテトラゾリウム化合物0.7~2.7 mmol/Lの範囲、アジ化ナトリウム0.2~1.5 mmol/Lの範囲である。具体的に、テトラゾリウム化合物がWST-3の場合、プロテアーゼ反応液における濃度が0.2~6 mmol/Lの範囲であることが好ましく、より好ましくは0.6~4 mmol/Lの範囲、特に好ましくは0.7~2.7 mmol/Lの範囲である。このようにテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを添加することにより、無添加の場合に比べて、その感度が、約1.2~3倍の範囲で向上する。

#### 【0109】

また、このプロテアーゼ試薬が、前述のようにメタロプロテアーゼを含有し、さらにCa化合物およびNa化合物を含む場合、前記プロテアーゼ反応液は、前記メタロプロテアーゼ濃度が100~10,000 KU/Lの範囲であるのに対して、例えば、Ca化合物0.1~50 mmol/Lの範囲、Na化合物5~1000 mmol/Lの範囲であり、好ましくはCa化合物0.2~10 mmol/Lの範囲、Na化合物10~500 mmol/Lの範囲であり、より好ましくはCa化合物0.2~5 mmol/Lの範囲、Na化合物30~500 mmol/Lの範囲である。

#### 【0110】

次に、前記プロテアーゼ反応液に前記発色用試薬を添加し、測定用FAODを糖化Hb分解物に作用させて、前記式(1)の反応により過酸化水素を生成させ、これと発色基質とを酸化還元酵素により反応させ、前記発色基質を酸化により発色させる。

#### 【0111】

測定用のFAOD- $\alpha$ Sは、前述のように、糖化された $\alpha$ -アミノ基および糖化された側鎖アミノ基の両方に作用する。しかし、予め、前処理用試薬中の分解

用FAOD- $\alpha$ によって処理されているため、糖化された側鎖アミノ基のみに測定用FAOD- $\alpha$ Sを作用させることができる。

#### 【0112】

発色用試薬の添加量は、例えば、前記プロテアーゼ反応液100 $\mu$ Lに対して、例えば、5～100 $\mu$ Lの範囲であり、好ましくは8～50 $\mu$ Lの範囲であり、より好ましくは10～30 $\mu$ Lの範囲である。前記発色用試薬を添加した発色反応溶液は、測定用FAOD濃度が0.5～200KU/Lの範囲、酸化還元酵素濃度が1～1000KU/Lの範囲、発色基質の濃度が0.001～100mmol/Lの範囲であることが好ましく、より好ましくは測定用FAOD濃度が1～100KU/Lの範囲、酸化還元酵素濃度が5～200KU/Lの範囲、発色基質の濃度が0.005～10mmol/Lの範囲であり、より好ましくは測定用FAOD濃度が2～100KU/Lの範囲、酸化還元酵素濃度が5～200KU/Lの範囲、発色基質の濃度が0.01～1mmol/Lの範囲である。また、前記発色反応溶液のpHは、6～9の範囲が好ましく、より好ましくは6.5～8の範囲である。

#### 【0113】

この発色反応は、前記発色用試薬を添加してから一定時間インキュベートすることが好ましく、その条件は、例えば、15～37℃、1～30分間であり、好ましくは25～37℃、3～10分間であり、より好ましくは30～37℃、3～5分間である。

#### 【0114】

つぎに、発色基質の発色を測定する。これは、例えば、発色反応溶液の発色程度（吸光度）を分光光度計で測定すればよく、この吸光度から、過酸化水素の量を決定する。そして、例えば、予め準備した過酸化水素量と糖化Hb量との相関関係を表わす検量線と、測定した過酸化水素量とを用いて、試料中の糖化Hb量を求めることができる。

#### 【0115】

なお、はじめに添加した分解用FAOD- $\alpha$ によって生成した過酸化水素は、血液試料（溶血試料）中にはじめから存在するカタラーゼによって消失するため

、FAOD- $\alpha$ Sにより生成した測定対象物由来の過酸化水素の測定には影響を及ぼすことはない。しかし、十分に前記過酸化水素を消去するために、前処理用試薬に、さらにカタラーゼを含有させてもよい。このように前記カタラーゼにより過酸化水素を消去する場合、後に添加する発色用試薬中の測定用FAOD- $\alpha$ S処理によって生成する過酸化水素までもが前記カタラーゼにより消去されることを防ぐために、発色用試薬中のPODおよび発色基質を過剰量含有させることが好ましい。

## 【0116】

この場合、前処理用試薬におけるカタラーゼの濃度は、例えば、5～300 U/Lの範囲であり、好ましくは10～100 U/Lの範囲であり、より好ましくは10～70 U/Lの範囲である。また、前記前処理反応液におけるカタラーゼ濃度は、例えば、1.5～50 U/Lの範囲であり、好ましくは1.5～30 U/Lの範囲であり、より好ましくは1.5～15 U/Lの範囲であり、前記発色反応溶液におけるカタラーゼ濃度は、例えば、1～50 U/Lの範囲であり、好ましくは1～30 U/Lの範囲であり、より好ましくは1～10 U/Lの範囲である。

## 【0117】

また、発色用試薬におけるPOD濃度は、例えば、5～1000 KU/Lの範囲であり、好ましくは10～200 KU/Lの範囲であり、より好ましくは20～200 KU/Lの範囲であり、発色反応溶液におけるPODの濃度は、例えば、3～300 KU/Lの範囲であり、好ましくは5～200 KU/Lの範囲であり、より好ましくは10～100 KU/Lの範囲である。

## 【0118】

また発色反応溶液におけるカタラーゼ(E)とPOD(F)の割合(活性比E:F)は、例えば、E:F=1:2～1:40の範囲であり、好ましくは1:3～1:20の範囲であり、より好ましくは1:4～1:10の範囲である。

## 【0119】

また、発色用試薬における発色基質濃度は、例えば、0.01～200 mol/Lの範囲であり、好ましくは0.02～20 mol/Lの範囲であり、より好



ましくは $0.04 \sim 5 \text{ mmol/L}$ の範囲であり、発色反応溶液における発色基質の濃度は、例えば、 $0.001 \sim 100 \text{ mmol/L}$ の範囲であり、好ましくは $0.005 \sim 10 \text{ mmol/L}$ の範囲であり、より好ましくは $0.01 \sim 1 \text{ mmol/L}$ の範囲である。

#### 【0120】

この測定キットを用いた測定において、各試薬の添加は、前記順序には限定されず、また、同時に添加してよい試薬もある。具体的には、試料に、例えば、前処理用試薬を添加した後、プロテアーゼ試薬と発色用試薬とを同時に添加してもよいし、前処理用試薬とプロテアーゼ試薬とを同時に添加した後に、発色用試薬を添加してもよい。また、試料に、例えば、プロテアーゼ試薬を添加した後、前処理用試薬を添加し、それから発色用試薬を添加してもよい。

#### 【0121】

なお、本発明の測定キットを用いれば、HbA1c量を迅速かつ簡便に、精度よく測定することもできる。これは本発明の測定キットを用いて測定した糖化Hb量は、HbA1cと高い相関関係にあるからである。具体的には、本発明の測定キットにより測定した糖化Hb量とHbA1c量との相関関係から検量線を作成し、前記測定キットにより試料中の糖化Hb量を測定して、この測定値を前記検量線に代入すればHbA1c量を求めることができる。

#### 【0122】

##### (実施形態2)

この実施形態は、前処理用試薬の分解用FAODと、発色用試薬の測定用FAODとに、同じFAODを用いた第2の測定キットの一例である。FAODとしては、特に制限されず、例えば、FAOD- $\alpha$ 、FAOD-S、FAOD- $\alpha$ Sのいずれを用いてもよい。なお、本実施形態の測定キットは、特に示さない限り前記実施形態1と同様の構成であり、また、同様にして糖化Hbの測定に使用できる。

#### 【0123】

FAODは、前述のように糖化タンパク質よりも糖化アミノ酸に作用し易いため、前記分解用FAODによって、糖化アミノ酸が分解される。しかし、前記実

施形態1と異なり、分解用FAODと測定用FAODとに、同じFAODを使用すると、以下のような問題が生じる。つまり、前処理反応液に、分解用FAODが残存している状態でプロテアーゼ試薬を加え、前記糖化Hbを分解すると、残存するFAODと糖化Hb分解物の糖化部分とが反応してしまい、正確な測定ができないという問題が起こるのである。したがって、同じFAODを使用する場合は、プロテアーゼ試薬のプロテアーゼによって、糖化Hbを分解し、かつ、前記前処理反応液に残存する分解用FAODを失活させて、前記糖化Hb分解物との反応を防止する必要がある。このために、前処理用試薬の分解用FAODを速やかに失活させ、かつ、糖化Hbを分解できるだけのプロテアーゼをプロテアーゼ試薬に含有させる必要がある。

## 【0124】

前記プロテアーゼの種類や含有量は、特に制限されないが、例えば、使用するFAODの種類や量、プロテアーゼのFAODに対する基質特異性、糖化Hb量等や、反応溶液への添加による希釈割合によって、適宜決定することが好ましい。このようなFAODとプロテアーゼの組み合わせとしては、例えば、商品名FOD（旭化成社製）と商品名トヨチーム（東洋紡社製）、前記ギベレラ属由来FAODと商品名プロテナーゼK（ロシュ社製）のプロテアーゼ等があげられる。

## 【0125】

具体的には、プロテアーゼ反応液におけるプロテアーゼ濃度が、前記分解用FAOD100U/Lに対して、例えば、1～1000, 000KU/Lの範囲になるように前記プロテアーゼ試薬を添加することが好ましく、より好ましくはプロテアーゼ濃度10～300, 000KU/Lの範囲であり、特に好ましくは100～100, 000KU/Lの範囲である。具体的に、プロテアーゼとしてトリプシンを使用する場合は、例えば、前記プロテアーゼ反応液中のトリプシン濃度1000～30, 000KU/L、血球濃度0.2～5体積%、分解用FAOD濃度10～100U/Lとなるように、前記プロテアーゼ試薬を添加することが好ましい。また、反応条件としては、例えば、温度20～50℃、時間10分～20時間、pH6～9である。

## 【0126】

また、本実施形態においては、発色用試薬中の測定用FAODまでもが、前記プロテアーゼによって失活するおそれがあるため、前記測定用FAODを十分量添加する必要がある。

## 【0127】

具体的には、測定用FAOD処理の反応溶液における測定用FAOD濃度が、プロテアーゼ10,000KU/Lに対して、例えば、10~1000,000U/Lの範囲になるように、前記発色用試薬を添加することが好ましく、より好ましくは測定用FAOD濃度100~200,000U/Lの範囲、特に好ましくは測定用FAOD濃度500~50,000U/Lの範囲となるように前記発色用試薬を添加することが好ましい。

## 【0128】

具体的な処理条件としては、例えば、反応液中の測定用FAOD濃度500~20,000U/リットル、反応液中のプロテアーゼ濃度100~30,000KU/リットル、反応液中の血球濃度0.01~1体積%となるように、前記発色用試薬を添加することが好ましい。また、反応条件としては、例えば、温度15~40℃、時間1分~1時間、pH6~9の範囲である。

## 【0129】

## (実施形態3)

この実施形態は、前処理用試薬の分解用FAODと、発色用試薬の測定用FAODにFAOD- $\alpha$ Sとに、同じFAODを用いた第3の測定キットの一例である。但し、この実施形態は、前記実施形態2とは異なり、前処理用試薬の分解用FAODを、プロテアーゼによって必ずしも失活させる必要がない。酵素には基質特異性があるため、プロテアーゼとFAODとの組み合わせによっては、FAODをプロテアーゼで失活させ難い場合がある。このような場合に本実施形態の測定キットが有効になる。なお、前処理用試薬中の分解用FAODが糖化Hb分解物と反応すると、測定精度を向上できないため、以下に示すように、前処理用試薬と発色用試薬とにおけるFAODの添加割合を調整することが重要となる。

## 【0130】

前記FAODとしては、特に制限されず、例えば、FAOD- $\alpha$ 、FAOD-

S、FAOD- $\alpha$ Sのいずれを用いてもよい。また、本実施形態の測定キットは、特に示さない限り前記実施形態1と同様の構成であり、また、同様にして糖化Hbの測定に使用できる。

#### 【0131】

このような実施形態に該当するFAODとプロテアーゼの組み合わせとしては、例えば、商品名FOD（旭化成社製）およびギベレラ属由来FAOD（アークレイ社製、特開平-154672号公報）と、商品名トリプシン（シグマ社製）および商品名プロティナーゼK（和光純薬工業社製）等があげられる。

#### 【0132】

前記分解用FAODは、その活性が残存しても、プロテアーゼ処理の間に糖化Hb分解物に作用しない範囲で添加する必要がある、かつ、糖化アミノ酸に作用しやすく、糖化タンパク質に作用し難いという性質を利用するため、糖化アミノ酸のみに作用する程度の添加量であることが望ましい。

#### 【0133】

具体的には、前処理用試薬における分解用FAOD濃度は、例えば、10～20,000U/Lの範囲であり、好ましくは20～10,000U/Lの範囲であり、より好ましくは100～5000U/Lの範囲である。発色用試薬における測定用FAOD濃度は0.5～200KU/Lの範囲であり、好ましくは1～100KU/Lの範囲であり、より好ましくは2～100KU/Lの範囲である。

#### 【0134】

そして、前記前処理試薬は、前処理反応液において、例えば、分解用FAOD濃度10～5000U/L、血球濃度0.2～20体積%となるように添加することが好ましい。

#### 【0135】

この測定キットを使用する場合、分解用FAODを含有する前処理用試薬による処理は、FAODが糖化アミノ酸に作用しやすく糖化タンパク質に作用し難いという性質を利用するため、例えば、糖化アミノ酸のみに作用する程度の反応時間であることが好ましい。具体的には、反応温度20～37℃、反応時間1分～

60分であることが好ましく、より好ましくは反応温度25～37℃、反応時間2分～30時間であり、特に好ましくは反応温度30～37℃、反応時間3分～10時間である。

## 【0136】

本実施形態においては、発色反応溶液における分解用FAOD (G) と測定用FAOD (H) との割合 (活性比G : H) が、例えば、 $G : H = 1 : 3 \sim 1 : 100$  の範囲となるように、前記前処理用試薬および発色用試薬を添加することが好ましく、より好ましくはG : Hが1 : 5～1 : 50の範囲であり、特に好ましくはG : Hが1 : 10～1 : 40の範囲である。このように設定すれば、前記実施形態2と異なり前記分解用FAODはプロテアーゼ反応溶液中に残存するが、この残存したFAODの反応速度は非常に遅いため、プロテアーゼ処理工程において、測定に影響を与える程度に、生成した糖化Hb分解物に残存FAODが作用することはないからである。

## 【0137】

## (実施形態4)

この実施形態は、発色用試薬の発色基質としてDA-64を用いた例である。なお、本実施形態の測定キットは、特に示さない限りは、前記実施形態1と同様の構成であり、また、同様にして糖化Hbの測定に使用できる。

## 【0138】

プロテアーゼ試薬が、前述のように測定感度の向上のためにテトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを含有し、発色用試薬が発色基質としてDA-64を含有する場合、発色反応溶液中で、前記テトラゾリウム化合物、アジ化ナトリウムおよびDA-64が共存することによって、前述のようなDA-64の誤発色が生じてしまう。したがって、この誤発色を防止するためには、以下の組成とすることが好ましい。

## 【0139】

前処理用試薬、プロテアーゼ試薬および発色用試薬のうち少なくともいずれかが、界面活性剤を含有することが好ましい。前記界面活性剤としては、例えば、前述のような界面活性剤が使用できる。

## 【0140】

前処理用試薬に含有させる場合、その濃度は、 $0.03 \sim 200 \text{ mmol/L}$ の範囲であり、好ましくは $0.1 \sim 50 \text{ mmol/L}$ の範囲である。プロテアーゼ試薬に含有させる場合、その濃度は、 $0.01 \sim 50 \text{ mmol/L}$ の範囲であり、好ましくは $0.05 \sim 20 \text{ mmol/L}$ の範囲である。発色用試薬に含有させる場合、その濃度は、 $0.06 \sim 30 \text{ mol/L}$ の範囲であり、好ましくは $0.1 \sim 20 \text{ mol/L}$ の範囲である。

## 【0141】

そして、発色反応溶液における各成分が以下の濃度範囲となるように、測定キットの各試薬を添加すればよい。前記発色反応溶液において、例えば、DA-64  $0.001 \sim 100 \text{ mmol/L}$ 、界面活性剤  $0.002 \sim 50 \text{ mmol/L}$ 、テトラゾリウム化合物  $0.1 \sim 10 \text{ mmol/L}$ 、アジ化ナトリウム  $0.08 \sim 4 \text{ mmol/L}$ の範囲でありことが好ましく、より好ましくは、DA-64  $0.005 \sim 10 \text{ mmol/L}$ 、界面活性剤  $0.005 \sim 20 \text{ mmol/L}$ 、テトラゾリウム化合物  $0.6 \sim 5 \text{ mmol/L}$ 、アジ化ナトリウム  $0.15 \sim 1.8 \text{ mmol/L}$ の範囲であり、特に好ましくはDA-64  $0.01 \sim 1 \text{ mmol/L}$ 、界面活性剤  $0.02 \sim 10 \text{ mmol/L}$ 、テトラゾリウム化合物  $0.7 \sim 2.7 \text{ mmol/L}$ 、アジ化ナトリウム  $0.2 \sim 1.5 \text{ mmol/L}$ の範囲である。

## 【0142】

また、この発色反応溶液のpHは、 $6.0 \sim 9.0$ の範囲が好ましく、より好ましくは $6.5 \sim 8.5$ の範囲、特に好ましくは $7.0 \sim 8.0$ の範囲である。

## 【0143】

前記DA-64は、酸化還元反応により発色するため、この反応液について、例えば、検出波長 $650 \sim 750 \text{ nm}$ の範囲における吸光度（発色程度）を分光光度計で測定すれば、過酸化水素の量を測定できる。

## 【0144】

## 【実施例】

## (実施例 1)

この実施例は、本発明の第1の測定キットを用いて糖化Hbの測定を行った例である。

## 【0145】

患者から全血試料を採取し（患者数163名）、赤血球を自然沈降させて回収した。そして、この沈降した赤血球画分10 $\mu$ Lに、下記前処理用試薬600 $\mu$ Lを添加して溶血試料を調整した（n=163）。なお、この試料は、赤血球を自然沈降させた画分を使用するため、血漿も含有している。

## 【0146】

（前処理用試薬：pH9.4）

CHAPS	50 mmol/L
界面活性剤（商品名NIKKOL-BL9EX、ニッコーミカ社製）	9 g/L
FAOD（商品名FAOX、キョーマン社製）	1 KU/L

## 【0147】

次に、得られた溶血試料20 $\mu$ Lと下記プロテアーゼ試薬76 $\mu$ Lを混合して、37℃で5分間インキュベートした。続いて、さらに下記発色試薬19 $\mu$ Lを添加して37℃で3分間インキュベートし、この際の波長751 nmおよび波長571 nmにおける吸光度を測定した。吸光度の測定には、自動分析装置（商品名JCA-BM8、日本電子社製）を使用した。

## 【0148】

（プロテアーゼ試薬：pH5.5）

テトラゾリウム化合物（商品名WST-3、同仁化学社製）	2 mmol/L
NaN <sub>3</sub>	0.6 mmol/L
NaCl	100 mmol/L
CaCl <sub>2</sub>	2 mmol/L
中性プロテアーゼ（アール社製）	4 MU/L
MES	1 mmol/L

## 【0149】

(発色試薬: pH 7.0)

商品名 DA-64 (和光純薬工業社製)

80  $\mu$ mol/L

FAOD (アークレイ株式会社製)

36 KU/L

Tris-HCl

380 mmol/L

Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub>

0.5 mmol/L

#### 【0150】

そして、予め作成した Hb 濃度 (g/L) または HbA1c 濃度 (g/L) と、吸光度との関係を示す各検量線に、測定したそれぞれの吸光度を代入して HbA1c 濃度および Hb 濃度を求め、下記式から HbA1c % を算出した。なお、Hb 濃度は波長 751 nm の吸光度から、HbA1c 濃度は波長 571 nm の吸光度から求めることができる。

#### 【0151】

$$\text{HbA1c (\%)} = (\text{HbA1c 濃度} / \text{Hb 濃度}) \times 100$$

#### 【0152】

なお、前記検量線は、以下に示す方法により作成した。まず、HbA1c 濃度および Hb 濃度が既知である種々濃度の標準液について、商品名 HA-8160 (アークレイ社製) を用いた HPLC 法により HbA1c 濃度と Hb 濃度とを測定した。一方、前記各標準液について、前記実施例と同様の測定方法により、Hb 濃度および HbA1c 濃度に相当する吸光度の測定を行った。そして、前記自動測定器による測定値と前記吸光度から一次回帰式を作成し、これを検量線とした。

#### 【0153】

また、対照例としては、前記実施例 1 において調製した溶血試料 (n = 163) を試料とし、前記 HPLC 法によって測定した値を使用した。

#### 【0154】

以上の結果を図 1 に示す。同図は、酵素法により測定した実施例 1 の HbA1c (%) と、HPLC 法による対照例の HbA1c (%) との関係を示すグラフである。同図において、実施例の相関式は、「 $y = 1.031x - 0.09$ 」、相関係数は「0.981」であった。



## 【0155】

このように、本発明の測定キットを用いた実施例によれば、対照例の値と非常に近い値が得られ、その相関係数（0.981）も非常に高いことから、優れた精度で糖化Hbを測定できることがわかった。

## 【0156】

## 【発明の効果】

以上のように、本発明の糖化タンパク質の測定キットを用いれば、共存する糖化アミノ酸の影響を排除できるため、優れた精度で糖化タンパク質の測定が可能であり、かつ、テトラゾリウム化合物およびアジ化ナトリウムを用いるため、測定感度も向上する。このため、本発明の測定キットを、例えば、赤血球中の糖化HbやHbA1cの測定に適用すれば、従来よりも信頼性の高い測定値が得られることから、糖化HbやHbA1cの糖尿病診断等の指標物質としての重要性がさらに向上する。

## 【図面の簡単な説明】

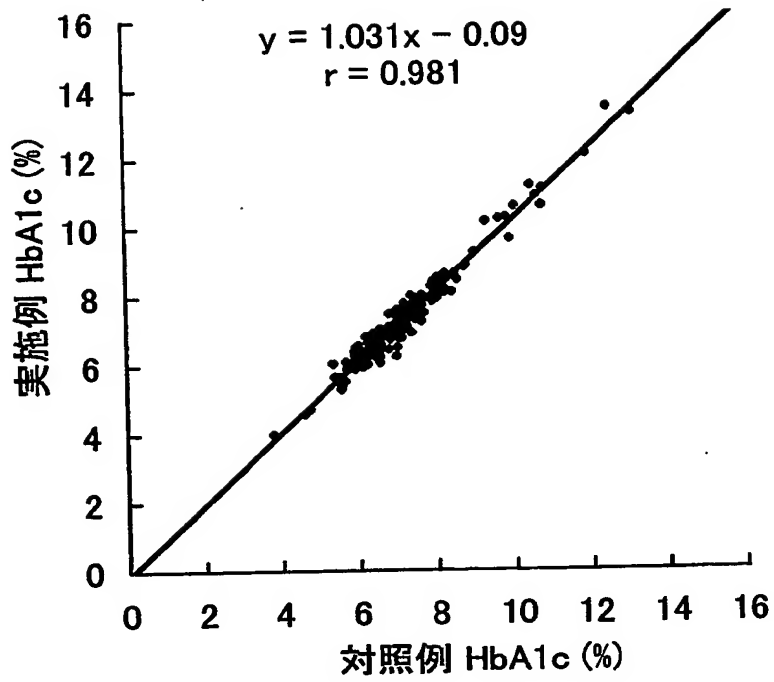
## 【図1】

本発明の測定方法の一実施例において、酵素法によるHbA1c量と、HPLC法によるHbA1c量との相関関係を示すグラフである。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 測定精度および測定感度に優れる糖化タンパク質の測定キットを提供する。

【解決手段】 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（FAOD）を含有する前処理用試薬と、プロテアーゼを含有するプロテアーゼ試薬、およびFAOD、酸化還元酵素ならびに発色基質を含有する発色用試薬を調製する。糖化タンパク質を含む試料に前記前処理用試薬を添加して、前記糖化タンパク質とは別に存在する前記試料中の糖化アミノ酸を分解し、その後、前記プロテアーゼ試薬を添加して糖化タンパク質を分解し、さらに前記発色用試薬を添加して前記糖化タンパク質の分解物にFAODを作用させ、その酸化還元反応を測定することによって糖化タンパク質量を求める。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000141897]

1. 変更年月日

2000年 6月12日

[変更理由]

名称変更

住 所

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

氏 名

アークレイ株式会社